

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-128398

⑬ Int. Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)5月31日

C 07 K 15/06
A 61 K 35/14
37/04
C 07 K 3/12
3/20
3/22

8619-4H
8615-4C
8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 血漿蛋白の分画方法

⑯ 特 願 平2-183321

⑰ 出 願 平2(1990)7月10日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)7月12日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-181672

㉑ 発 明 者 上 村 八 尋 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ
十字中央研究所内
㉒ 発 明 者 武 智 和 男 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ
十字中央研究所内
㉓ 発 明 者 田 中 憲 次 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ
十字中央研究所内
㉔ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号
㉕ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

血漿蛋白の分画方法

2. 特許請求の範囲

血漿蛋白含有物を、以下の工程順序にて処理する(但し、(ii)~(v)工程は各々その順序は入れ替えてもよい)ことを特徴とする血漿蛋白の分画方法。

(i) 凍結・融解、

(ii) エタノール濃度5~10%での処理、

(iii) 陰イオン交換体による処理、

(iv) 固定化リジンによるアフィニティークロマトグラフィー処理、

(v) 固定化ヘパリンによるアフィニティークロマトグラフィー処理、

(vi) エタノール濃度18~30%での処理、および

(vii) エタノール濃度35~45%での処理。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は血漿蛋白含有物、特に血漿から血漿蛋白を効率よく各種血漿蛋白成分に分画する方法に関する。

(従来技術)

血漿蛋白は血漿に含まれる蛋白の総称であり、100種類以上の蛋白成分からなる。血漿蛋白の主な成分はアルブミン、グロブリン、各種血液凝固因子、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、プラスミノーゲン、プロトロンビン等である。血漿からこれらの血漿蛋白成分に分画する方法としては、コーンの低温エタノール分画法、硫酸分画法、ポリエチレングリコール分画法等が知られている。

ところで、従来は血漿蛋白成分中でもアルブミン、グロブリンが医薬上、特に有用であったために、それらの成分をまず分画・回収し、他のマイナー成分はその廃棄成分から再分画・回収する方法が一般的であった。例えば後述の従来法で示したような方法が用いられる。

しかし、この方法では、マイナー成分は回収効

率が悪く、血漿蛋白の分離方法全体としてみると必ずしも効率の良い手段とは言えない。

〔発明が解決しようとする課題〕

そこで、本発明者らは上記事情を鑑み、各種検討を重ねた結果、特定の工程を特定の順序に従って組み合わせることにより、血漿含有物、特に血漿から血漿蛋白を効率よく分離できることを見出し、本発明を完成した。

〔課題を解決するための手段〕

即ち、本発明は血漿蛋白含有物を、以下の工程順序にて処理する（但し、(i)～(v)工程の順序は各々その順序を入れ換えてもよい）ことを特徴とする血漿蛋白の分離方法。

(i) 凍結・融解、

(ii) エタノール濃度5～10%での処理、

(iii) 陰イオン交換体による処理、

(iv) 固定化リジンによるアフィニティークロマトグラフィー処理、

(v) 固定化ヘパリンによるアフィニティークロマトグラフィー処理、

例えば血液、血漿、血清等（特に、血漿が好ましい）が用いられる。

2. 分離方法

以下に分離方法を説明するが、第Ⅱ法以下の工程において、各処理工程における処理条件は、第Ⅰ工程と同様である。

第Ⅰ法

(i) 凍結・融解処理

血漿蛋白含有物を凍結・融解処理して上清と沈澱を分離する。沈澱成分より血液凝固第Ⅶ因子（以下第Ⅶ因子という）、フィブロンectinの回収が可能である。

当該処理における処理条件は、好適には次の通りである。

凍結条件：温度 $-10\sim-40^{\circ}\text{C}$ 、特に $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ 、1時間以上

融解条件：温度 $0\sim5^{\circ}\text{C}$

分離条件：濾過、又は遠心分離による（回転数 $1000\sim3000\text{ rpm}$ 、10分間）、温度 $0\sim5^{\circ}\text{C}$

(vi) エタノール濃度18～30%での処理、および

(vii) エタノール濃度35～45%での処理に関する。

本発明の分離方法としては、具体的には以下の工程順序が例示される。

I. (i) → (ii) → (iii) → (iv) → (v) → (vi) → (vii)

II. (i) → (ii) → (iv) → (iii) → (v) → (vi) → (vii)

III. (i) → (iii) → (ii) → (iv) → (v) → (vi) → (vii)

IV. (i) → (iii) → (iv) → (v) → (ii) → (vi) → (vii)

V. (i) → (iv) → (iii) → (v) → (ii) → (vi) → (vii)

これらのうち、好ましいのは第Ⅰ、ⅡおよびⅢ法であり、特に好ましいのは第Ⅰ法である。

1. 出発原料

本発明の出発原料としては血漿蛋白含有物、例

(ii) エタノール濃度5～10%処理

(ii)の上清をエタノール濃度5～10%、特に7～9%で処理して上清と沈澱とを分離する。沈澱成分よりフィブリノーゲン、血液凝固第XIII因子（以下第XIII因子という）の回収が可能である。

当該処理における処理条件は、好適には次の通りである。

エタノール処理条件：温度 $5\sim-3^{\circ}\text{C}$ （特に $-2\sim-3^{\circ}\text{C}$ ）、pH6.8～7.4、30分間～15時間（特に1～5時間）

分離条件：遠心分離による（回転数 $1000\sim8000\text{ rpm}$ 、10～30分間）、

温度 $0\sim5^{\circ}\text{C}$

(iii) 陰イオン交換体処理

(ii)の上清を陰イオン交換体で処理して非吸着成分と吸着成分を分離する。吸着成分から溶出操作によりプロトロンビン、血液凝固第IX因子（以下第IX因子という）、プロテインCを回収可能である。陰イオン交換体としては、DEAE系（例えば、DEAE-アガロース、DEAE-デキ

ストラン、DEAE-セルロースなど)、QAE系(例えば、QAE-アガロース、QAE-デキストランなど)等が挙げられる。

当該処理における処理条件は、好適には次の通りである。

接触条件: pH 6 ~ 8

溶出条件: pH 4 ~ 8、イオン強度 0.005 ~ 0.5 M (特に、0.01 ~ 0.2 M)

(iv) 固定化リジン処理

(iii) の非吸着画分を固定化リジンを用いて、アフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。吸着画分から溶出操作によりプラスミノーゲンの回収が可能である。固定化リジンとしてはリジン-アガロース等が挙げられる。その製法はScience, 170, 1095 (1970)等に関連されている。

当該処理における処理条件は、好適には次の通りである。

接触条件: pH 6 ~ 8

溶出条件: pH 6 ~ 8 の EACA (ε-アミノカ

間)

分離条件: コーンのエタノール画分の画分 II + III を回収する条件と同様でよい。例えば、遠心分離 (回転数 5000 ~ 20000 rpm、10 ~ 30 分間、温度 0 ~ 5℃) による分離が好適である。

(vi) エタノール濃度 35 ~ 45% 処理

(vi) の上清をエタノール濃度 35 ~ 45% で処理して上清と沈殿を分離する。沈殿画分よりハプトグロビン、トランスフェリンを、上清画分よりアルブミンを回収可能である。

エタノール処理条件: pH 5 ~ 7、(特に、pH 5.8 ~ 6.3) 温度 0 ~ 7℃ (特に、-6 ~ -5℃)、30 分間 ~ 15 時間 (特に、1 ~ 5 時間)

分離条件: コーンのエタノール画分の画分 IV + IV、+ アルブミンを回収する条件と同様でよく、例えば遠心分離 (回転数 5000 ~ 20000 rpm、10 ~ 30 分間、温度 0 ~ 5℃) によることが好

ブロン酸、0.1 ~ 0.4 M) またはリジン

(0.1 ~ 0.4 M) 含有液

(v) 固定化ヘパリン処理

(iv) の非吸着画分を固定化ヘパリンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、非吸着画分と吸着画分とを分離する。吸着画分からの溶出操作によりアンチトロンビン III の回収が可能である。固定化ヘパリンとしてはヘパリン-アガロース等が挙げられる。

接触条件: pH 6 ~ 8 (特に、pH 7 ~ 7.5)

溶出条件: pH 6 ~ 8 (特に、pH 7 ~ 7.5)、イオン強度 1 ~ 3 M (特に、1.5 ~ 2 M)

(vi) エタノール濃度 18 ~ 30% 処理

(v) の非吸着画分をエタノール濃度 18 ~ 30%、好ましくは 20 ~ 25% で処理して上清と沈殿を分離する。沈殿画分より免疫グロブリンの回収が可能である。

エタノール処理条件: pH 4.5 ~ 8 (特に、pH 5.2 ~ 7)、温度 0 ~ 7℃ (特に、-5 ~ -6℃)、30 分間 ~ 15 時間 (特に、1 ~ 5 時

間である。

第 II 法

工程(i)、(ii)、(vi) および (vii) は第 I 法と同様の方法で行われる。

(iv) 固定化リジン処理

(ii) の上清を固定化リジンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(iii) 陰イオン交換体処理

(iv) の非吸着画分を陰イオン交換体で処理して、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(v) 固定化ヘパリン処理

(iii) の非吸着画分を固定化ヘパリンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。

第 III 法

工程(i)、(v)、(vi) および (vii) は第 I 法と同様の方法で行われる。

(iii) 陰イオン交換体処理

(i) の上清を陰イオン交換体で処理して、吸着

画分と非吸着画分を分離する。

(ii) エタノール濃度5～10%処理

(iii) の非吸着画分をエタノール濃度5～10%で処理して、上清と沈澱を分離する。

(iv) 固定化リジン処理

(ii) の上清を固定化リジンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。

第IV法

工程(i)、(iv)、(v) および (vi) は第I法と同様の方法で行われる。

(iii) 陰イオン交換体処理

(i) の上清を陰イオン交換体で処理して、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(ii) エタノール濃度5～10%処理

(v) の非吸着画分をエタノール濃度5～10%で処理して、上清と沈澱を分離する。

(vi) エタノール濃度18～30%処理

(ii) の上清をエタノール濃度18～30%で処理して、上清と沈澱を分離する。

3. 精製方法

分画された血漿蛋白は公知の手法により単離、精製される。

(i) 第VII因子、フィブロンectin

第VII因子の単離、精製法は、特開昭59-134730号、同63-108000号の各公報等に開示されている。また、ポリエチレングリコール分画法(米国特許第3,631,018号明細書)、グリシン沈澱分画法(米国特許第3,652,530号明細書)、陰イオン交換体処理法(特公昭55-12890号公報)等が例示される。フィブロンectinの単離、精製法は、特開昭57-140724号、同58-121220号、同59-67228号の各公報等に開示されている。

(ii) フィブリノゲン、第XIII因子

フィブリノゲンの単離、精製法は、特開昭62-89628号、同64-19023号の各公報等に開示されている。また、第XIII因子の単離、精製法は、特開昭56-166121号、同53-72811号の各公報等に開示されている。

(iii) 第IX因子、プロトロンビン、プロテインC

第V法

工程(i)および(vii)は第I法と同様の方法で行われる。

(iv) 固定化リジン処理

(i) の上清を固定化リジンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(iii) 陰イオン交換体処理

(iv) の非吸着画分を陰イオン交換体で処理して、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(v) 固定化ヘパリン処理

(iii) の非吸着画分を固定化ヘパリンを用いてアフィニティクロマトグラフィーによる処理を行い、吸着画分と非吸着画分を分離する。

(ii) エタノール濃度5～10%処理

(v) の非吸着画分をエタノール濃度5～10%で処理して、上清と沈澱を分離する。

(vi) エタノール濃度18～30%処理

(ii) の上清をエタノール濃度18～30%で処理して、上清と沈澱を分離する。

第IX因子の単離、精製法は、特開昭62-10019号、同63-48720号、特開昭63-84458号の各公報等に開示されている。

プロトロンビンの精製については、無機塩に対する吸着性を利用する方法、陰イオン交換体を用いる方法、アフィニティクロマトグラフィーを用いる方法等が、例えば下記の刊行物によって知られている。

・ J. Biol. Chem., **174**, 565 (1954)

・ Am. J. Physiol., **172**, 731 (1953)

・ 生化学, **40**(12), 890～901 (1968)

・ 特公昭58-50202号公報

・ J. Biol. Chem., **234**, 2857 (1959)

・ 特開昭63-290829号公報

プロテインCの精製方法としては、塩化バリウムによる沈澱吸着法、硫酸分画、陰イオン交換体による処理、調製用電気泳動、プロテインCに対する抗体カラム、夾雑蛋白質に対する抗体カラム等が知られている。(J. Biol. Chem., **251**, 355～363 (1976)、同、**258**, 1914～1920 (1983), J.

Nero Med. Ass., 35, 448 ~ 454 (1984), J. Biol. Chem., 261, 11097 ~ 11105 (1986), Thromb. Haemostas., 48, 1 ~ 5 (1983), 特願昭63-54159号公報]

(iv) アンチトロンビン-Ⅲ

アンチトロンビン-Ⅲの単離、精製法は、特開昭48-35017号、特公昭59-7693号、特願昭63-105783号、同63-155740号の各公報等に開示されている。

(v) プラスミノゲン

プラスミノゲンの単離、精製法は、Science, 170, 1095 (1970)、特開昭55-153592号公報、同63-239300号公報等に開示されている。

(vi) 免疫グロブリン

例えば、特開昭53-47515号公報、同57-32228号、同63-183539号公報等に記載の方法に準ずればよい。また、加熱処理も行うことが好ましく、例えば液状加熱としては特開昭61-191622号、同63-146832号の各公報等、乾燥加熱としては特開昭61-78730号、同62-228024号、同62-283933

号、同62-289523号の各公報等に記載の方法に準ずればよい。

(vii) ハプトグロビン

特開昭50-77516号、同63-17889号の各公報等に開示の方法に準ずればよい。

(viii) アルブミン

アルブミンの精製方法として、エタノール分画法(特公昭35-5297号、同47-2869号等の各公報)、加熱処理法(特公昭43-1403号、同51-40132号の各公報等)が例示される。

〔効果〕

本発明の方法によれば、血漿蛋白含有物、特に血漿から血漿蛋白を効率よく各種血漿蛋白成分に分画することができる。

〔実験例〕

下記表2に記載の本発明法と下記表3に記載の従来法による各種血漿蛋白成分の回収効率を表1に示した。

(以下余白)

表 1

血漿蛋白成分	本発明法
第Ⅴ因子	×1
フィブロネクテン	※
フィブリノゲン	×1
第Ⅹ因子	※
プラスミノゲン	×3
トロンビン	×3
第Ⅸ因子	×1
プロテインC	※
アンチトロンビン-Ⅲ	×3
免疫グロブリンG	×1
免疫グロブリンA	×1
免疫グロブリンM	×1
ハプトグロビン	×1
トランスフェリン	×1
アルブミン	×1

表中、×1は従来法と同程度の回収率、×3は従来法に比べて3倍程度回収率が改善されたことを示す。※は従来法では回収されず、本発明法によって回収された血漿蛋白である。

以下に本発明法および従来法の血漿蛋白の回収工程を示す。

(以下余白)

表2-1 (本発明法)

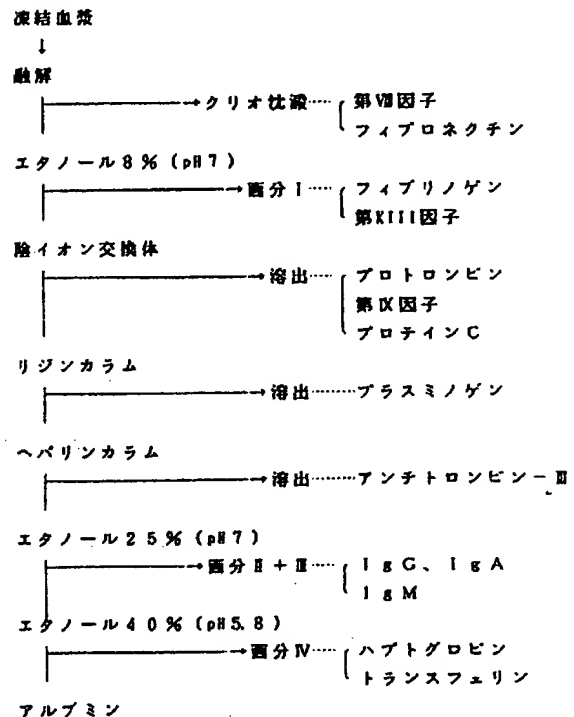


表2-2(本発明法)

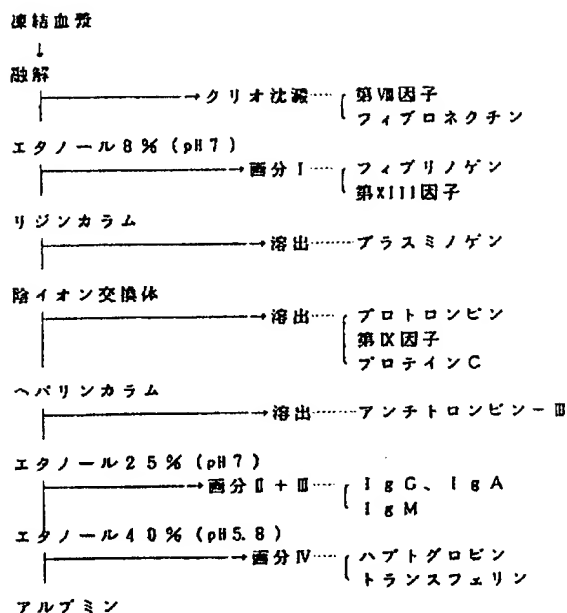


表2-3(本発明法)

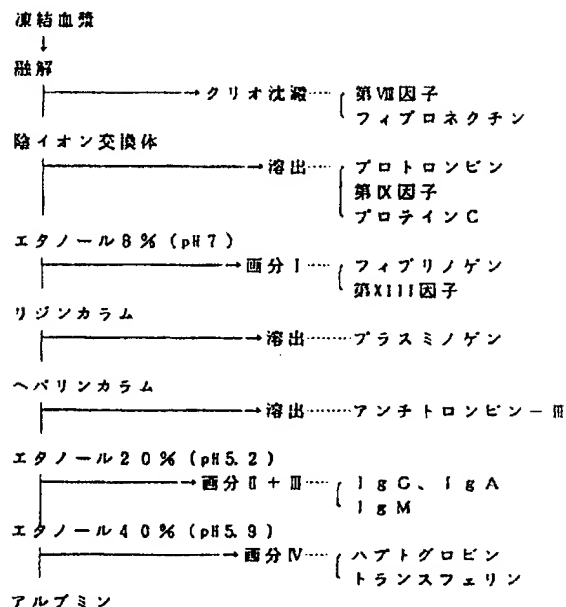
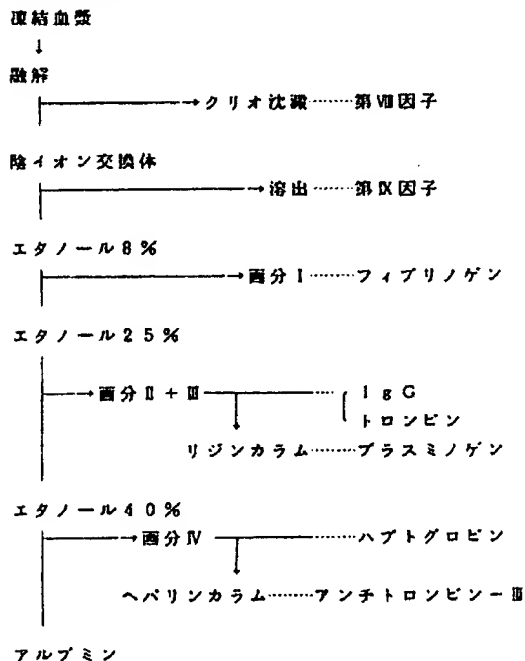


表3(従来法)



〔実施例〕

実施例1

H B s A 陰性 H I V 抗体陰性の正常人血液をクエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取し、遠心分離により血漿を得た。この血漿を直ちに -30°C 以下に急凍した。このようにして凍結された血漿10gを $2\sim 10^{\circ}\text{C}$ の冷室で徐々に融解し、液温が $1\sim 3^{\circ}\text{C}$ に上昇した後、直ちに遠心分離して不溶物(クリオ沈澱)を回収した。

上清に、予め -20°C に冷却された53%エタノールを加え、終エタノール濃度を8%とした。液温は $-1\sim 1^{\circ}\text{C}$ 、pH7.0であった。この条件下で2時間静置後、3000rpmで20分間遠心分離し、沈澱(画分Ⅰ)を回収した。

予め0.02Mの塩化ナトリウムで平衡化されたセファロースQファストフローを湿重量で1kg充填した10cm径のカラムに遠心上清を $4\sim 10^{\circ}\text{C}$ 、2g/時間の流速で注入し、プロトロンビン、第Ⅹ因子、プロテインC等を吸着させた。このセファロースQファストフローカラムを通過した透明な濾液をリジン-セファロースカラム(10cm径、2g)およびヘパリン-セファロースカラム(10

cm後、0.5 l)に順次通過させた。リジン-セファロースカラムにはプラスミノゲンが、ヘパリン-セファロースカラムにはアンチトロンビンⅢがそれぞれ吸着された。

濾液に予め-20℃に冷却されたエタノールを加え、終濃度25%とした。pH7.0、-3℃で2時間静置後、析出した沈殿(画分Ⅱ+Ⅲ)を10000 rpmで20分間遠心分離し、上清を回収した。

この上清に-30℃に冷却されたエタノールを追加し、終濃度40%、pH5.8、-5℃で2時間静置後、10000 rpmで20分間遠心分離し、沈殿(画分Ⅳ)と上清を別々に回収した。

参考例

(1) クリオ沈殿から第Ⅶ因子およびフィブロンネクチンの精製

クリオ沈殿をヘパリン100IU/mlを含む注射用水に懸濁し、20~30℃で抽出した。得られた抽出液に水酸化アルミニウムゲルを添加し、プロトロンビンを吸着除去し、0.3%TNBP(化学名:トリ(n-ブチル)ホスフェート)/1%

前記のセファロースQファストフローを20mMトリス緩衝液(pH7.15)に懸濁し、10cm径のカラムへ充填した。同じ溶液をカラム容積の2倍量流下させ、洗浄した。次にpH7.15、0.3M塩化ナトリウムをカラム容積の2倍量流下させて第Ⅸ因子を溶出させた。

さらにpH7.15、0.35M塩化ナトリウムをカラム容積の2倍量流下させてプロトロンビンを溶出させた。

さらにpH7.15、0.4M塩化ナトリウムをカラム容積の2倍量流下させてプロテインCを溶出させた。

(3-1) プロトロンビン画分にトロンボプラスチンおよび新鮮ヒト血漿を加え、トロンビンへ転換させた。この粗トロンビン溶液にプロテアーゼ阻害剤として4%EACAを、ウィルス不活化剤として0.3%TNBP/1%Tween 80を添加し、30℃、6時間のウィルス不活化処理を行った。そして、S-P-セファデックスでトロンビンを吸着し、精製した。

Tween 80を添加して、30℃、6時間のウィルス不活化処理をした。そして2Mグリシン分画でフィブリノゲンを沈殿して除去し、上清を得た。この上清に1.5M塩化ナトリウムを添加し、沈殿に第Ⅶ因子を、上清にフィブロンネクチンを回収した。第Ⅶ因子はゲル濾過によりさらに高度精製した。また、フィブロンネクチンは上清を冷却し、塩化ナトリウムを3Mとすることにより沈殿させて回収した。

(2) 画分Ⅰから第ⅩⅡ因子含有フィブリノゲンの精製

画分Ⅰの沈殿を0.9%塩化ナトリウム溶液で溶解し、プロテアーゼ阻害剤として5%EACAを、ウィルス不活化剤として0.3%TNBP/1%Tween 80を添加して、30℃、6時間のウィルス不活化処理を行った。そして、2Mグリシンを添加し、第ⅩⅡ因子含有フィブリノゲンを沈殿して回収した。

(3) セファロースQファストフローからプロトロンビン、第Ⅸ因子、プロテインCの溶出

(3-2) 第Ⅸ因子画分を抗Ⅸマウスモノクローナル抗体を結合させたゲルにアプライし、第Ⅸ因子画分を吸着した。そして未吸着画分にプロトロンビンを回収した。抗体ゲルに吸着した第Ⅸ因子はpH2.5のグリシン-塩酸緩衝液で溶出し、水酸化ナトリウムでpHを中性にした後、抗マウス抗体で混入している微量のマウスIgGを吸着除去した。

(3-3) プロテインCの精製

i) 20mM酢酸ナトリウム、pH5.0の緩衝液で透析した。透析後、10,000Gで20分間遠心分離して上清画分を回収した。

ii) 陽イオン交換クロマトグラフィー

上清画分をBakerbond CBxに添加した。開始バッファーに20mM酢酸ナトリウム、pH5.0を、溶出バッファーに1M塩化ナトリウム、20mM酢酸ナトリウム、pH5.0を使用した。試料添加後開始バッファーで洗浄した後、溶出バッファーに切換え、バス画分を回収した。

iii) 陰イオン交換クロマトグラフィー

透析後液をMono Q HR 60/10(またはQ Sepharose

High Performance 60/100) に添加した。開始バッファに 20 mM トリス塩酸、pH 7.15 を、溶出バッファに 1 M 塩化ナトリウム、20 mM トリス塩酸、pH 7.15 を使用した。試料添加後、30% (v/v) 溶出バッファ／開始バッファで洗浄した後、30%→40% 溶出バッファ／開始バッファのリニアグラジェント溶出を行い、活性画分を回収した。

iv) ゲル濾過クロマトグラフィー

透析後液を Superose 12 prep grade 60/600 に添加した。溶離バッファに 20 mM トリス塩酸、500 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2 緩衝液を使用し、活性画分を回収した。

v) 硫酸デキストランクロマトグラフィー

透析後液を硫酸デキストランをリガンドにしたセファロース CL4B に添加した。開始バッファには 25 mM イミダゾール、pH 6 を、溶出バッファには 1 M 塩化ナトリウム、25 mM イミダゾール、pH 6.0 を使用した。試料添加後、0%→50% 溶出バッファ／開始バッファのリニアグラジ

エント溶出を行い、活性画分を回収した。

液下させ、不純蛋白を洗浄した。ブラスミノゲンは 0.2 M EACA 溶液 (pH 7.0) にて溶出した。このブラスミノゲン画分を分画分子量 30000 の限外濾過膜を用いて 200 IU/㎖ に濃縮した。この濃縮液にアプロチニン (最終濃度 50 U/㎖) を添加し、60℃ で 10 時間加熱した。

0.05 M リン酸緩衝液、0.05 M 塩化ナトリウム、0.2% リジン含有の褥媒で一夜透析し、リジルトイプのブラスミノゲンを得た。除菌濾過後、凍結乾燥した。

本品を 250 IU/㎖ に再溶解し、ウサギへ 1 ㎖/kg ずつ静脈内投与し、発熱試験を行ったところ、生物学的製剤基準に合格した。

(5) ヘパリンセファロースからアンチトロンビンⅢの精製

アンチトロンビンⅢを吸着したヘパリンセファロースカラムをカラム容積の 4 倍量の 0.4 M 塩化ナトリウム (pH 7.0) で洗浄後、2 M 塩化ナトリウム (pH 7.0) でアンチトロンビンⅢを溶出した。

vi) 逆相クロマトグラフィー

得られた画分を C8 をリガンドとした逆相カラムに添加した。ストック溶液 A (0.1% テトラフルオロ酢酸含有蒸留水)・B (800 ㎖のアセトニトリルを A 液で 1,000 ㎖としたもの) を調製し、開始バッファは 400 ㎖の B 液に A 液を加えて 1,000 ㎖とし (アセトニトリル最終濃度 32%)、溶出バッファは 500 ㎖の B 液に A 液を加えて 1,000 ㎖として (アセトニトリル最終濃度 40%) 使用した。開始バッファで洗浄後、0%→50% 溶出バッファ (実際のアセトニトリル濃度は 32%→36%) のリニアグラジェント溶出を行った。分画後各フラクション中の有機溶媒を減圧乾燥させた。

(4) リジンセファロースからブラスミノゲンの精製

ブラスミノゲンを吸着したリジンセファロースカラムをカラム容積の 2 倍量の 0.9% 塩化ナトリウムおよび同量の 1.0 M 塩化ナトリウムで順次

このアンチトロンビンⅢの水溶液にクエン酸ナトリウムを 0.6 M の濃度に加え、pH 7.8 に調整した後、60℃ で 10 時間の加熱処理を施した後、塩化ナトリウム (最終濃度 3 M) およびクエン酸ナトリウム (最終濃度 20 mM) を添加し、pH 7.5 に調整した。一方、3 M 塩化ナトリウム含有 20 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したブチル型ポリビニル系担体 (ブチルトヨバル 650、東洋曹達製) にアンチトロンビンⅢ含有水溶液を接触させた後に上記緩衝液で展開し、未吸着画分を回収をした。続いて、0.9% 塩化ナトリウム溶液に対して一夜透析を行い、濃縮してアンチトロンビンⅢの 1 (w/v%) 水溶液を得、必要に応じて、濾過または遠心分離を行って透明な液とした。

(6) 画分Ⅱ+Ⅲから 1 g C の精製

画分Ⅱ+Ⅲ 10 kg を冷蒸留水 30 ℓ に懸濁 (pH 5.5)、よく攪拌の後、遠心分離により澄清な上清を回収した。この上清 1 ℓ 当たりソルビトールを 500 g 添加し、pH 5.5 にて 60℃ 10 時間加

特開平3-128398(9)

熱した。加熱後、冷蔵留水で3~5倍に希釈し、ポリエチレングリコール4000を終濃度が5%になるように添加し、析出した不溶物を遠心分離により除去した。

上清のpHを8.0に修正し、ポリエチレングリコール4000を12%濃度に添加し析出した1gを回収した。

(7) 画分IVからハプトグロビンの精製

画分IV 30kgをpH8.2の0.05酢酸アンモニウム緩衝液140ℓに懸濁した後、硫酸アンモニウムを35%飽和となるように加え、生じた沈澱を遠心分離して除いた。この上清をpH7.5に調整した後、軽質無水珪酸(アエロジル(ジグサ社製))1kgを加え、室温で1時間攪拌した。その後遠心分離して上清を回収した。上清中にハプトグロビンは70%回収され、溶液の濁りも完全に除去できた。

(8) アルブミンの精製

コーンの低温エタノール分画法第6法に従って、精製を行った。

i) 得られた上清をエタノール40%、pH4.8、-5℃で処理して生じた沈澱を回収する(第V画分)。

ii) 沈澱を適当な溶媒に溶解し、エタノール10%、pH4.5、-3℃で処理して上清を回収する。

iii) 上清をエタノール40%、pH5.2、-5℃で処理して生じた沈澱を回収し、精製アルブミンとして得た。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高 島 一

